



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107402298 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201610328921.X

(22)申请日 2016.05.18

(71)申请人 上海新吉而生物科技有限公司

地址 200086 上海市虹口区大连路1079号
603室

(72)发明人 朱劼远 李宝良 焦伟 杨安
姚霞 范继康

(74)专利代理机构 上海宏京知识产权代理事务
所(普通合伙) 31297

代理人 周高

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

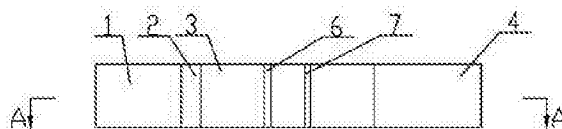
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒及其
使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒及其使用方法,该犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒,包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,在底板的左部顶端固定有样品垫,在样品垫的右部与底板之间固定有金标垫,在底板的右部顶端固定有吸水垫,在金标垫与吸水垫之间固定有硝酸纤维素膜。本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的敏感性、特异性和稳定性,能够随身携带,即时即地进行现场的测试,不需要专门的测试辅助设备,缩短了测试时间,提高了测试效率,另外,本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒对犬粪进行测试,防止了对犬的伤害,使得检测工作更为简便。



1. 一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒, 其特征在于: 其包括样品垫(1)、金标垫(2)、硝酸纤维素膜(3)、吸水垫(4)和底板(5), 在所述底板(5)的左部顶端固定有所述样品垫(1), 在所述样品垫(1)的右部与所述底板(5)之间固定有所述金标垫(2), 在所述底板(5)的右部顶端固定有所述吸水垫(4), 在所述金标垫(2)与所述吸水垫(4)之间固定有所述硝酸纤维素膜(3), 所述硝酸纤维素膜(3)的高度均低于所述金标垫(2)右部高度和所述吸水垫(4)左部的高度, 在所述硝酸纤维素膜(3)的上端面纵向划有检测线(6), 在所述检测线(6)右方的所述硝酸纤维素膜(3)的上端面纵向划有质控线(7), 其中:

所述金标垫(2)按下述步骤得到:

第一步, 将适量的氯金酸溶于超纯水并制成质量百分比为0.01%的氯金酸水溶液, 将氯金酸水溶液煮沸后得到氯金酸沸液, 然后向氯金酸沸液中加入质量百分比为1%的柠檬酸三钠溶液并搅拌, 当加入柠檬酸三钠溶液后的氯金酸沸液变红时, 继续将氯金酸沸液煮沸5分钟后得到二次氯金酸沸液, 接着将二次氯金酸沸液冷却到37℃后得到冷却液, 向冷却液中溶入叠氮化钠后得到胶体金处理溶液, 将胶体金处理溶液采用0.22μm滤膜进行除菌过滤后得到胶体金溶液, 其中: 叠氮化钠的加入量按照每100ml的氯金酸水溶液加入20mg的叠氮化钠;

第二步, 用0.1mol/L的碳酸钾溶液将胶体金溶液的PH值调节至9.0后得到碱性胶体金溶液, 向碱性胶体金溶液中加入溶解在硼酸盐缓冲液中的混合抗体免疫球蛋白并搅拌得到搅拌液, 搅拌液经过15分钟的搅拌后, 向搅拌液中加入质量百分比为10%的牛白蛋白水溶液并搅拌30分钟后得到一次胶体金标记抗体溶液, 其中: 每毫升碱性胶体金溶液中加入18.5μg至32.5μg的混合抗体免疫球蛋白, 混合抗体免疫球蛋白包括兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白, 兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白与兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白的体积比为1:1, 牛白蛋白在一次胶体金标记抗体溶液中的质量百分含量为1%;

第三步, 将一次胶体金标记抗体溶液在转速为2000rpm下离心20分钟后得到上清液, 然后将上清液于4℃下 20000×g离心60分钟后得到一次清液和一次沉淀, 弃去一次清液, 向一次沉淀中加入与氯金酸水溶液等体积的重悬液 I, 重悬液 I 为含有重量百分比为1%的牛白蛋白的硼酸盐缓冲液, 将一次沉淀重新混合后, 在4℃下 20000×g离心60分钟后得到二次上清液和二次沉淀, 弃去二次上清液, 接着向二次沉淀中加入氯金酸水溶液体积的五分之一的重悬液 II 并混和后得到胶体金标记抗体溶液, 其中: 重悬液 II 为含有重量百分比为5%的蔗糖、0.05%的吐温-20和0.05%的叠氮化钠的硼酸盐缓冲液; 第四步, 将玻璃纤维经过脱脂酪蛋白浸泡处理并干燥后得到预处理金标垫, 然后, 用胶体金标记抗体溶液对预处理金标垫进行浸泡包被, 浸泡时间为60分钟, 每平方厘米的预处理金标垫用150μl的胶体金标记抗体溶液进行包被, 最后将经过浸泡包被后的预处理金标垫进行真空干燥后得到金标垫, 真空干燥的真空度为200Pa;

所述检测线(6)按下述步骤得到: 第一步, 将兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白进行等体积混合后得到混合抗体免疫球蛋白; 第二步, 用摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释混合抗体免疫球蛋白后得到混合抗体免疫球蛋白稀释液, 其中: 每4mg的混合抗体免疫球蛋白用1ml的碳酸盐缓冲液进行稀释;

第三步,用混合抗体免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜上划线包被得到检测线;
所述质控线(7)按下述步骤得到:

第一步,将山羊抗兔免疫球蛋白用摩尔浓度为0.01mol/L、PH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释后得到山羊抗兔免疫球蛋白稀释液,在山羊抗兔免疫球蛋白稀释液中,山羊抗兔免疫球蛋白的浓度为2mg/ml;

第二步,用山羊抗兔免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜上划线包被得到质控线。

2.根据权利要求1所述的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜(3)是经过碳化二亚胺盐酸盐溶液活化处理的;或/和,所述样品垫(1)用含有重量百分比为1%的牛白蛋白、1%的蔗糖、0.1%的吐温-20和0.02%的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液预处理,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.01mol/L、PH值为7.4;或/和,所述金标垫(2)用含有重量百分比为1%的脱脂酪蛋白的磷酸盐缓冲液进行预处理,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度是0.05 mol/L、PH值为7.2。

3.根据权利要求1或2所述的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒,其特征在于,将划有检测线(6)和质控线(7)的硝酸纤维素膜(3)用封闭液在37℃下浸泡封闭60分钟并真空干燥,其中:所述封闭液为摩尔浓度为0.02mol/L、pH值为7.2的磷酸盐缓冲液,所述封闭液含有重量百分比为2%的牛白蛋白、1%的聚乙二醇20000和0.5%的吐温-20。

4.根据权利要求1或2所述的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒,其特征在于,所述硼酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.005mol/L、PH为9.0。

5.根据权利要求1所述的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒,其特征在于所述玻璃纤维是Whatman glass 33;或/和,所述硝酸纤维素膜(3)为Millipore 135。

6.一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒的使用方法,其特征在于:其按下述步骤进行:将20μl的犬粪悬液上清液滴加在样品垫(1)上,当所述犬粪悬液上清液在所述样品垫(1)上扩散并未到达检测线(6)时,再向所述样品垫(1)上滴加100μl至150μl的硼酸盐缓冲液,观察15分钟至30分钟,其中:硼酸盐缓冲液的摩尔浓度是0.005mol/L、pH值为9.0。

7.根据权利要求6所述的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒的使用方法,其特征在于:所述犬粪悬液上清液按下述方法得到:

第一步,将犬粪加入经过除菌过滤后的犬粪保存液中得到犬粪悬液,其中:犬粪保存液为含有重量百分比为0.02%的叠氮化钠、0.3%的吐温-20和1%的牛白蛋白的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液的摩尔浓度为0.15mol/L、PH值为7.2;每2ml的犬粪保存液加入1g的犬粪;

第二步,犬粪悬液经过15分钟的离心后得到犬粪悬液上清液。

一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及犬类细粒棘球绦虫检测技术领域,具体而言,涉及一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)及其使用方法。

背景技术

[0002] 细粒棘球绦虫是人类和家畜(绵羊、牛和骆驼等)囊型包虫病的病原。细粒棘球绦虫有两个生活阶段,其中的一个生活阶段为成虫阶段,成虫阶段雌雄同体,寄生在家犬小肠中,通过头节上的头钩和吸盘固定在小肠粘膜上,通过自体或异体交配完成受精过程。成虫由四节组成:头节、颈节、成节和孕节。受精卵在孕节子宫内发育成熟后,孕节脱落崩解,虫卵随粪便排出,污染环境,牲畜在食草过程中吞入虫卵,然后虫卵进入消化道后,被消化液激活,孵化出六钩蚴,六钩蚴穿过肠粘膜并进入血流,其可在身体各部着床发育为棘球蚴(包虫囊),引起包虫病。常见的包虫病是肝包虫病、肺包虫病和腹腔包虫病。六钩蚴也可侵犯其他器官和部位造成脑包虫病、骨包虫病和肾包虫病等等。包虫囊内囊壁上的生发细胞发育成原头节,家犬或其他食肉目动物吞食了包虫病羊的内脏后,原头节固定在肠粘膜上,发育为成虫,开始新一轮的生活循环,因而犬和其他食肉目动物是细粒棘球绦虫的终宿主;人和家畜是其中间宿主。

[0003] 囊型包虫病的传播过程可按下述过程进行:宰杀患有包虫病的绵羊后,把寄生有包虫囊的内脏或组织喂犬,或丢弃后的寄生有包虫囊的内脏或组织被犬吞食,棘球蚴内的原头节在犬肠道内发育为成虫后,随粪便排出虫卵,污染环境,牲畜通过吃草、饮水或其他途径食入虫卵而被感染。而人的感染除了食入被虫卵污染的蔬菜、果实外,由于感染犬的体表常常沾染有虫卵,人特别是儿童在触摸家犬时,手上沾染的虫卵进入口腔而被感染。因此,牲畜包虫病的预防和控制除了保证环境卫生和个人卫生外,关键的有效措施是防止家犬感染和及时发现感染的家犬并进行驱虫,而家犬感染的及时发现和驱虫效果的监测、考核都需要敏感性高和特异性强的诊断技术。因而提供有效的诊断工具是保证包虫病预防控制措施落实的关键任务。

[0004] 细粒棘球绦虫感染的诊断技术发展现状如下所示,

1、剖检法:将家犬处死后,剖腹取出小肠,收取肠内容物并刮下肠粘膜后,用水反复冲洗、沉淀后,从沉淀物中收集成虫,通过形态学鉴定,确定家犬感染,此法只能用于家犬中成虫感染状况的调查;

2、漂浮法检查犬粪标本中的虫卵:此法避免了必须处死家犬的问题,但由于带科绦虫的虫卵形态是相同的,检出虫卵后,在显微镜下无法区分其属和种;

3、槟榔碱导泻法:槟榔碱能使棘球绦虫虫体麻痹而从肠粘膜上脱落下来,同时具有导泻作用,引起家犬腹泻,家犬在灌服氢溴酸槟榔碱溶液后1小时左右即产生腹泻,同时排出大量成虫,这一方法虽然费时费力并有被犬咬伤的风险,但效果可靠,至今仍被做为诊断家犬棘球绦虫感染的金标准;

4、免疫学方法—酶联免疫吸附试验(ELISA):20世纪90年代初,欧洲学者采用ELISA技

术,建立了检测犬粪抗原诊断细粒棘球绦虫感染的方法,并迅速在澳大利亚和新西兰推广应用,公开号为1299972的中国专利文献公开了采用细粒棘球绦虫成虫虫体可溶性抗原免疫家兔血清IgG抗体,建立双抗体夹心ELISA方法具有高度敏感性和特异性,检测相应抗原的下限达到2.5 ng/ml,此项技术在西部四省区大规模用于家犬感染水平的调查和对家犬驱虫效果的检测,在包虫病防控工作中发挥了巨大作用,虽然ELISA 技术具有足够的敏感性和特异性但需要专门的仪器和实验室设备,无法在农牧区现场进行,并且测试时间较长,限制了其在防控和监测细粒棘球绦虫感染中的广泛应用;

5、分子生物学技术——多聚酶链扩增技术(PCR):设计特异性DNA引物,扩增犬粪标本中棘球绦虫特异性DNA片段,用来诊断犬棘球绦虫感染,具有高度敏感性和特异性,但由于其需要专门仪器和实验室条件而无法在农牧区现场应用。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)及其使用方法,克服了上述现有技术之不足,其能有效解决现有在检测犬棘球绦虫感染的过程中存在的检测时间长、费时费力、需要专门的测试辅助设备的问题。

[0006] 本发明的目的之一,提供了一种犬包虫病抗原快速检测试剂盒,本发明的犬包虫病抗原快速检测试剂盒是通过以下技术方案来实现的:

一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法),包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板,在底板的左部顶端固定有样品垫,在样品垫的右部与底板之间固定有金标垫,在底板的右部顶端固定有吸水垫,在金标垫与吸水垫之间固定有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的高度均低于金标垫右部高度和吸水垫左部的高度,在硝酸纤维素膜的上端面纵向划有检测线,在检测线右方的硝酸纤维素膜的上端面纵向划有质控线,其中:

金标垫按下述步骤得到:第一步,将适量的氯金酸溶于超纯水并制成质量百分比为0.01%的氯金酸水溶液,将氯金酸水溶液煮沸后得到氯金酸沸液,然后向氯金酸沸液中加入质量百分比为1%的柠檬酸三钠溶液并搅拌,当加入柠檬酸三钠溶液后的氯金酸沸液变红时,继续将氯金酸沸液煮沸5分钟后得到二次氯金酸沸液,接着将二次氯金酸沸液冷却到37℃后得到冷却液,向冷却液中溶入叠氮化钠后得到胶体金处理溶液,将胶体金处理溶液采用0.22μm滤膜进行除菌过滤后得到胶体金溶液,其中:叠氮化钠的加入量按照每100ml的氯金酸水溶液加入20mg的叠氮化钠;第二步,用0.1mol/L的碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH值调节至9.0后得到碱性胶体金溶液,向碱性胶体金溶液中加入溶解在硼酸盐缓冲液中的混合抗体免疫球蛋白并搅拌得到搅拌液,搅拌液经过15分钟的搅拌后,向搅拌液中加入质量百分比为10%的牛白蛋白水溶液并搅拌30分钟后得到一次胶体金标记抗体溶液,其中:每毫升碱性胶体金溶液中加入18.5μg至32.5μg的混合抗体免疫球蛋白,混合抗体免疫球蛋白包括兔抗细粒棘球绦虫原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白,兔抗细粒棘球绦虫原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白与兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白的体积比为1:1,牛白蛋白在一次胶体金标记抗体溶液中的质量百分含量为1%;第三步,将一次胶体金标记抗体溶液在转速为2000rpm下离心20分钟后得到上清液,然后将上清液于4℃下 20000×g离心60分钟后得到一次清液和一次沉淀,弃去一次清液,向一次沉淀中加入与氯金酸水溶液等体积的重悬液 1,重悬液 1为含有重量百分

比为1%的牛白蛋白的硼酸盐缓冲液,将一次沉淀重新混合后,在4℃下 20000×g离心60分钟后得到二次上清液和二次沉淀,弃去二次上清液,接着向二次沉淀中加入氯金酸水溶液体积的五分之一的重悬液Ⅱ并混和后得到胶体金标记抗体溶液,其中:重悬液Ⅱ为含有重量百分比为5%的蔗糖、0.05%的吐温-20和0.05%的叠氮化钠的硼酸盐缓冲液;第四步,将玻璃纤维经过脱脂酪蛋白浸泡处理并干燥后得到预处理金标垫,然后,用胶体金标记抗体溶液对预处理金标垫进行浸泡包被,浸泡时间为60分钟,每平方厘米的预处理金标垫用150μl的胶体金标记抗体溶液进行包被,最后将经过浸泡包被后的预处理金标垫进行真空干燥后得到金标垫,真空干燥的真空度为200Pa;

检测线按下述步骤得到:第一步,将兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白进行等体积混合后得到混合抗体免疫球蛋白;第二步,用摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为 9.6的碳酸盐缓冲液稀释混合抗体免疫球蛋白后得到混合抗体免疫球蛋白稀释液,其中:每4mg的混合抗体免疫球蛋白用1ml的碳酸盐缓冲液进行稀释;第三步,用混合抗体免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜上划线包被得到检测线;

质控线按下述步骤得到:第一步,将山羊抗兔免疫球蛋白用摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为 9.6的碳酸盐缓冲液稀释后得到山羊抗兔免疫球蛋白稀释液,在山羊抗兔免疫球蛋白稀释液中,山羊抗兔免疫球蛋白的浓度为2mg/ml;第二步,用山羊抗兔免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜上划线包被得到质控线。

[0007] 下面是对上述发明技术方案之一的进一步优化或/和改进:

上述硝酸纤维素膜可为经过碳化二亚胺盐酸盐溶液活化处理后的硝酸纤维素膜;或/和,样品垫为用含有重量百分比为1%的牛白蛋白、1%的蔗糖、0.1%的吐温-20和0.02%的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液预处理后的样品垫,磷酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液;或/和,金标垫为用含有重量百分比为1%的脱脂酪蛋白的磷酸盐缓冲液进行预处理后的金标垫,磷酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.05mol/L、pH值为7.2的磷酸盐缓冲液。

[0008] 上述将划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜可用封闭液在37℃下浸泡封闭60分钟并真空干燥,其中:封闭液为摩尔浓度为0.02mol/L、pH值为7.2的磷酸盐缓冲液,封闭液含有重量百分比为2%的牛白蛋白、1%的聚乙二醇20000和0.5%的吐温-20。

[0009] 优选地,上述硼酸盐缓冲液可为摩尔浓度为0.005mol/L、pH为 9.0的硼酸盐缓冲液。

[0010] 优选地,上述玻璃纤维可为Whatman glass 33 玻璃纤维;或/和,硝酸纤维素膜为Millipore 135 硝酸纤维素膜。

[0011] 本发明的另外一个方面的目的,是公开了一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)的使用方法,其是通过以下技术方案来实现的:

一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)的使用方法,按下述步骤进行:将20μl的犬粪悬液上清液滴加在样品垫上,当犬粪悬液上清液在样品垫上扩散并未到达检测线时,再向样品垫上滴加100μl至150μl的硼酸盐缓冲液,观察15分钟至30分钟,其中:硼酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.005 mol/L、pH值为9.0的硼酸盐缓冲液。

[0012] 下面是对上述发明技术方案之二的进一步优化或/和改进:

上述犬粪悬液上清液可按下述方法得到：第一步，将犬粪加入经过除菌过滤后的犬粪保存液中得到犬粪悬液，其中：犬粪保存液为含有重量百分比为0.02%的叠氮化钠、0.3%的吐温-20和1%的牛白蛋白的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.15 mol/L、pH值为7.2的磷酸盐缓冲液，每2ml的犬粪保存液加入1g的犬粪；第二步，犬粪悬液经过15分钟的离心后得到犬粪悬液上清液。

[0013] 本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的敏感性、特异性和稳定性，能够随身携带，即时即地进行现场的测试，不需要专门的测试辅助设备，缩短了测试时间，提高了测试效率，尤其适用于农牧区的使用，另外，本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)对犬粪进行测试，防止了对犬的伤害，使得检测工作更为简便。

附图说明

[0014] 附图1为本发明中犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒的俯视结构示意图。

[0015] 附图2为附图1中A-A向的剖视结构示意图。

[0016] 图中，1-样品垫，2-金标垫，3-硝酸纤维素膜，4-吸水垫，5-底板，6-检测线，7-质控线。

具体实施方式

[0017] 本发明不受下述实施例的限制，可根据本发明的技术方案与实际情况来确定具体的实施方式。

[0018] 在发明中，为了便于描述，在实施例中各部件的相对位置关系的描述均是根据说明书附图1的布图方式来进行描述的，如：上、下、左、右等的位置关系是依据说明书附图的布图方向来确定的。

[0019] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步描述：

实施例1

如图1至2所示，该犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)，包括样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4和底板5，在底板5的左部顶端固定有样品垫1，在样品垫1的右部与底板5之间固定有金标垫2，在底板5的右部顶端固定有吸水垫4，在金标垫2与吸水垫4之间固定有硝酸纤维素膜3，硝酸纤维素膜3的高度均低于金标垫2右部高度和吸水垫4左部的高度，在硝酸纤维素膜3的上端面纵向划有检测线6，在检测线6右方的硝酸纤维素膜3的上端面纵向划有质控线7，其中：

金标垫2按下述步骤得到：

第一步，将适量的氯金酸溶于超纯水并制成质量百分比为0.01%的氯金酸水溶液，将氯金酸水溶液煮沸后得到氯金酸沸液，然后向氯金酸沸液中加入质量百分比为1%的柠檬酸三钠溶液并搅拌，当加入柠檬酸三钠溶液后的氯金酸沸液变红时，继续将氯金酸沸液煮沸5分钟后得到二次氯金酸沸液，接着将二次氯金酸沸液冷却到37℃后得到冷却液，向冷却液中溶入叠氮化钠后得到胶体金处理溶液，将胶体金处理溶液采用0.22μm滤膜进行除菌过滤后得到胶体金溶液，其中：叠氮化钠的加入量按照每100ml的氯金酸水溶液加入20mg的叠氮化钠；

第二步，用0.1mol/L的碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH值调节至9.0后得到碱性胶体金

溶液,向碱性胶体金溶液中加入溶解在硼酸盐缓冲液中的混合抗体免疫球蛋白并搅拌得到搅拌液,搅拌液经过15分钟的搅拌后,向搅拌液中加入质量百分比为10%的牛白蛋白水溶液并搅拌30分钟后得到一次胶体金标记抗体溶液,其中:每毫升碱性胶体金溶液中加入18.5 μ g至32.5 μ g的混合抗体免疫球蛋白,混合抗体免疫球蛋白包括兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白,兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白与兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白的体积比为1:1,牛白蛋白在一次胶体金标记抗体溶液中的质量百分含量为1%;

第三步,将一次胶体金标记抗体溶液在转速为2000rpm下离心20分钟后得到上清液,然后将上清液于4℃下 20000 $\times$ g离心60分钟后得到一次清液和一次沉淀,弃去一次清液,向一次沉淀中加入与氯金酸水溶液等体积的重悬液 I,重悬液 I为含有重量百分比为1%的牛白蛋白的硼酸盐缓冲液,将一次沉淀重新混合后,在4℃下 20000 $\times$ g离心60分钟后得到二次上清液和二次沉淀,弃去二次上清液,接着向二次沉淀中加入氯金酸水溶液体积的五分之一的重悬液 II并混和后得到胶体金标记抗体溶液,其中:重悬液 II为含有重量百分比为5%的蔗糖、0.05%的吐温-20和0.05%的叠氮化钠的硼酸盐缓冲液;

第四步,将玻璃纤维经过脱脂酪蛋白浸泡处理并干燥后得到预处理金标垫,然后,用胶体金标记抗体溶液对预处理金标垫进行浸泡包被,浸泡时间为60分钟,每平方厘米的预处理金标垫用150 μ l的胶体金标记抗体溶液进行包被,最后将经过浸泡包被后的预处理金标垫进行真空干燥后得到金标垫2,真空干燥的真空度为200Pa;

检测线6按下述步骤得到:

第一步,将兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白进行等体积混合后得到混合抗体免疫球蛋白;

第二步,用摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为 9.6的碳酸盐缓冲液稀释混合抗体免疫球蛋白后得到混合抗体免疫球蛋白稀释液,其中:每4mg的混合抗体免疫球蛋白用1ml的碳酸盐缓冲液进行稀释;

第三步,用混合抗体免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜3上划线包被得到检测线6;

质控线7按下述步骤得到:

第一步,将山羊抗兔免疫球蛋白用摩尔浓度为0.01 mol/L、pH值为 9.6的碳酸盐缓冲液稀释后得到山羊抗兔免疫球蛋白稀释液,在山羊抗兔免疫球蛋白稀释液中,山羊抗兔免疫球蛋白的浓度为2mg/ml;

第二步,用山羊抗兔免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜3上划线包被得到质控线7。

[0020] 兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白按下述步骤得到:

第一步,制备细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原(EgPES Ag),从包虫囊内抽取囊液,然后,剪开包虫囊的囊壁,用囊液冲洗囊壁并将附着在囊壁上的育囊和原头节取出,将育囊和原头节注入无菌收集瓶内并在4℃下静置1小时得到一次沉淀物(含有原头节)和一次上清液,弃去一次上清液,将一次沉淀物在转速为2000 rpm下离心沉淀15分钟得到二次沉淀物(含有原头节)和二次上清液,弃去二次上清液,按二次沉淀物体积的5倍向二次沉淀物中加入双抗生理盐水(含庆大霉素200单位/ml、制霉菌素250单位/ml的0.9%氯化钠溶液)洗涤二次沉淀物,反复洗涤3次后得到原头节,接着,用含有双抗的RPMI 1640液体培养基(不加血

清)制成悬液(培养液,在培养液中含有重量百分比为1%至5%的家犬胆汁,家犬胆汁经过除菌过滤),每20 ml 至30 ml 的培养液加入2000个原头节,将装有原头节的培养基在37℃、CO₂的体积百分比为5%的组织培养箱中培养,在培养的过程中,于4小时和12小时各换培养液一次,以后每天换培养液一次,直至培养液由红色变为黄色时停止培养,将每次换下来的培养液合并起来得到含细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原的培养液,向含细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原的培养液中加入重量百分比为0.1%的叠氮化钠和苯甲基磺酰氟并浓缩后得到细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原,其中:每100ml的培养液加入1mmol的苯甲基磺酰氟;

第二步,制备细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原(EgAES Ag),将细粒棘球绦虫成虫用双抗生理盐水洗涤处理3次后,接着将细粒棘球绦虫成虫用RPMI 1640 培养液(不加血清)于37℃、CO₂的体积百分比为5%的条件下进行培养,绦虫成虫的加入量按照每20ml至30ml的RPMI 1640 培养液中加入200条绦虫成虫,在培养的过程中,于4小时和12小时各换培养液一次,以后每天换培养液一次,当培养液由红变黄时停止培养,将每次换下来的培养液集中起来得到含细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原的培养液,向含细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原的培养液中加入重量百分比为0.1%的叠氮化钠和苯甲基磺酰氟并浓缩后得到细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原,其中:每100ml的培养液加入1mmol的苯甲基磺酰氟;

第三步,兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白的制备和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白的制备,用考马斯亮蓝法分别测定细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原和细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原的蛋白含量后,分别用细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原和细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原对家兔进行免疫,用细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫家兔的一组作为细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫组,用细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫家兔的一组作为细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫组,每组免疫家兔3只,家兔为体重2公斤的新西兰种雄性白兔(出生6个月至1年)。每组按以下程序进行免疫:

第一次免疫:各取各组抗原3mg,向每种抗原中加入等体积的福氏完全佐剂,然后分别用福氏完全佐剂溶解后的抗原分别对各自相应免疫组于家兔的4足掌、背部肌肉、后腿肌肉共10个点注射;

第二次免疫:第一次免疫三周后,用3mg抗原加入5ml的福氏不完全佐剂,于双侧腋窝淋巴结周围皮下和双侧腹股沟淋巴结周围皮下共6个点进行注射免疫;

第三次免疫:第二次免疫两周后,用1mg抗原加生理盐水,于双侧腋下、腹股沟及背部皮下共6个点皮下注射免疫;

第三次免疫后第7天开始试血,于家兔耳静脉采血分离血清,用琼脂扩散试验测定抗体水平,在抗体效价达到1:128 以上时,将免疫家兔放血,分离血清,用饱和硫酸铵盐析法制取血清中的免疫球蛋白,每组将从血清中制取的免疫球蛋白依序经过用DE-52 纤维素(DEAE(DE-52)二乙氨基乙基纤维素)柱层析纯化和紫外分光法测定免疫球蛋白的含量后,得到每组相应的兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白。

[0021] 实施例2:

如附图1至2所示,该犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法),包括样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3、吸水垫4和底板5,在底板5的左部顶端固定有样品垫1,在样品垫1的右部与底板5之间固定有金标垫2,在底板5的右部顶端固定有吸水垫4,在金标垫2与吸水垫4

之间固定有硝酸纤维素膜3,硝酸纤维素膜3的高度均低于金标垫2右部高度和吸水垫4左部的高度,在硝酸纤维素膜3的上端面纵向划有检测线6,在检测线6右方的硝酸纤维素膜3的上端面纵向划有质控线7,其中:

金标垫2按下述步骤得到:

第一步,将适量的氯金酸溶于超纯水并制成质量百分比为0.01%的氯金酸水溶液,将氯金酸水溶液煮沸后得到氯金酸沸液,然后向氯金酸沸液中加入质量百分比为1%的柠檬酸三钠溶液并搅拌,当加入柠檬酸三钠溶液后的氯金酸沸液变红时,继续将氯金酸沸液煮沸5分钟后得到二次氯金酸沸液,接着将二次氯金酸沸液冷却到37℃后得到冷却液,向冷却液中溶入叠氮化钠后得到胶体金处理溶液,将胶体金处理溶液采用0.22μm滤膜进行除菌过滤后得到胶体金溶液,其中:叠氮化钠的加入量按照每100ml的氯金酸水溶液加入20mg的叠氮化钠;

第二步,用0.1mol/L的碳酸钾溶液将胶体金溶液的pH值调节至9.0后得到碱性胶体金溶液,向碱性胶体金溶液中加入溶解在硼酸盐缓冲液中的混合抗体免疫球蛋白并搅拌得到搅拌液,搅拌液经过15分钟的搅拌后,向搅拌液中加入质量百分比为10%的牛白蛋白水溶液并搅拌30分钟后得到一次胶体金标记抗体溶液,其中:每毫升碱性胶体金溶液中加入18.5μg或32.5μg的混合抗体免疫球蛋白,混合抗体免疫球蛋白包括兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白,兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白与兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白的体积比为1:1,牛白蛋白在一次胶体金标记抗体溶液中的质量百分含量为1%;

第三步,将一次胶体金标记抗体溶液在转速为2000rpm下离心20分钟后得到上清液,然后将上清液于4℃下 20000×g离心60分钟后得到一次清液和一次沉淀,弃去一次清液,向一次沉淀中加入与氯金酸水溶液等体积的重悬液 I,重悬液 I为含有重量百分比为1%的牛白蛋白的硼酸盐缓冲液,将一次沉淀重新混合后,在4℃下 20000×g离心60分钟后得到二次上清液和二次沉淀,弃去二次上清液,接着向二次沉淀中加入氯金酸水溶液体积的五分之一的重悬液 II并混和后得到胶体金标记抗体溶液,其中:重悬液 II为含有重量百分比为5%的蔗糖、0.05%的吐温-20和0.05%的叠氮化钠的硼酸盐缓冲液;第四步,将玻璃纤维经过脱脂酪蛋白浸泡处理并干燥后得到预处理金标垫,然后,用胶体金标记抗体溶液对预处理金标垫进行浸泡包被,浸泡时间为60分钟,每平方厘米的预处理金标垫用150μl的胶体金标记抗体溶液进行包被,最后将经过浸泡包被后的预处理金标垫进行真空干燥后得到金标垫2,真空干燥的真空度为200Pa;

检测线6按下述步骤得到:

第一步,将兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白进行等体积混合后得到混合抗体免疫球蛋白;

第二步,用摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为 9.6的碳酸盐缓冲液稀释混合抗体免疫球蛋白后得到混合抗体免疫球蛋白稀释液,其中:每4mg的混合抗体免疫球蛋白用1ml的碳酸盐缓冲液进行稀释;

第三步,用混合抗体免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜3上划线包被得到检测线6;

质控线7按下述步骤得到:

第一步,将山羊抗兔免疫球蛋白用摩尔浓度为0.01mol/L、pH值为 9.6的碳酸盐缓冲

液稀释后得到山羊抗兔免疫球蛋白稀释液,在山羊抗兔免疫球蛋白稀释液中,山羊抗兔免疫球蛋白的浓度为2mg/ml;

第二步,用山羊抗兔免疫球蛋白稀释液在硝酸纤维素膜3上划线包被得到质控线7。

[0022] 实施例3:

与上述实施例的不同之处在于,硝酸纤维素膜3为经过碳化二亚胺盐酸盐溶液活化处理后的硝酸纤维素膜;或/和,样品垫1为用含有重量百分比为1%的牛白蛋白、1%的蔗糖、0.1%的吐温-20和0.02%的叠氮化钠的磷酸盐缓冲液预处理后的样品垫1,磷酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.01 mol/L、pH值为7.4 的磷酸盐缓冲液;或/和,金标垫2为用含有重量百分比为1%的脱脂酪蛋白的磷酸盐缓冲液进行预处理后的金标垫,磷酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.05 mol/L、pH值为7.2的磷酸盐缓冲液。

[0023] 实施例4:

与上述实施例的不同之处在于,将划有检测线6和质控线7的硝酸纤维素膜3用封闭液在37℃下浸泡封闭60分钟并真空干燥,其中:封闭液为摩尔浓度为0.02 mol/L、pH值为7.2的磷酸盐缓冲液,封闭液含有重量百分比为2%的牛白蛋白、1% 的聚乙二醇20000和0.5%的吐温-20。

[0024] 实施例5:

与上述实施例的不同之处在于,硼酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.005 mol/L、pH为 9.0的硼酸盐缓冲液。

[0025] 实施例6:

与上述实施例的不同之处在于,玻璃纤维为Whatman glass 33 玻璃纤维;或/和,硝酸纤维素膜3为Millipore 135 硝酸纤维素膜。样品垫1为上海杰一生物科技有限公司提供的GL-1 型样品垫,吸水垫4为上海杰一生物科技有限公司提供的Whatman 470型吸水垫。

[0026] 实施例7:

该犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)的使用方法,按下述步骤进行:将20μl的犬粪悬液上清液滴加在样品垫1上,当犬粪悬液上清液在样品垫1上扩散并未到达检测线6时,再向样品垫1上滴加100μl 至150μl的硼酸盐缓冲液,观察15分钟至30分钟,其中:硼酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.005 mol/L、pH值为9.0的硼酸盐缓冲液。将犬粪悬液上清液滴加在样品垫1上时,犬粪悬液上清液(样品)在吸水垫4的吸引作用下,样品迅速向右流动,通过金标垫2时,如果样品中存在抗原(细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原或细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原),抗原即与相应的抗体结合形成抗体-抗原复合物并继续前进至检测线6时,被固定在检测线6上的捕捉抗体截获,形成金标抗体(兔抗细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原免疫球蛋白和兔抗细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原免疫球蛋白)-抗原-捕捉抗体复合物,样品在层析作用下由于金标抗体的富集而使检测线6呈现红色,金标抗体继续前进至质控线7时即被固定在此线上的山羊抗兔免疫球蛋白抗体捕获而使质控线7显示红色;质控线7的意义是表明检测试验成立,所以检测线6和质控线7都呈现红色表示试验成立,结果为阳性;而当样品中没有相应的抗原时,检测线6不显色,质控线7显色表示试验成立,结果为阴性;如果质控线7不显色,则表明试条失效。

[0027] 实施例8:

该犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)的使用方法,按下述步骤进行:将20μl

的犬粪悬液上清液滴加在样品垫1上,当犬粪悬液上清液在样品垫1上扩散并未到达检测线6时,再向样品垫1上滴加100 μ l 或150 μ l的硼酸盐缓冲液,观察15分钟至30分钟,其中:硼酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.005 mol/L、pH值为9.0的硼酸盐缓冲液。

[0028] 实施例9:

与上述实施例的不同之处在于,犬粪悬液上清液按下述方法得到:

第一步,将犬粪加入经过除菌过滤后的犬粪保存液中得到犬粪悬液,其中:犬粪保存液为含有重量百分比为0.02%的叠氮化钠、0.3%的吐温-20和1%的牛白蛋白的磷酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液为摩尔浓度为0.15 mol/L、pH值为7.2 的磷酸盐缓冲液,每2ml的犬粪保存液加入1g的犬粪;

第二步,犬粪悬液经过15分钟的离心后得到犬粪悬液上清液。

[0029] 对根据本发明上述实施例获得的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)的敏感性和特异性分别进行测试。

[0030] 通过敏感性测试,本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)检出细粒棘球蚴原头节排泄分泌抗原或细粒棘球绦虫成虫排泄分泌抗原的下限浓度至为25ng/ml,同时,对人工感染细粒棘球绦虫的实验犬,经槟榔碱驱虫证实为感染阳性80份犬粪样品中,用本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)检出阳性的74份,阳性率达到92.5%,说明本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的敏感性。

[0031] 在家犬肠道中存在各类绦虫:泡状带绦虫、多头带绦虫、犬复殖孔绦虫、犬弓首蛔虫、细粒棘球绦虫和多房棘球绦虫,在特异性测试中,自然感染泡状带绦虫的51只犬中,采用本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)检出阳性者1只,假阳性率1.96%;而在自然感染多头带绦虫(3只)、犬复殖孔绦虫(8只)和犬弓首蛔虫(13只)的家犬粪便标本共 24 份中,采用本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)检测结果全部呈阴性,由此说明本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的特异性。

[0032] 另外,对采用ELISA法检测细粒棘球绦虫的检测结果显示与采用本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)检测犬粪中细粒棘球绦虫的检测结果显示进行对比,检测对象为生存在北疆地区(乌鲁木齐县南郊农牧区、福海县、额敏县、裕民县和呼图壁县)的405只家犬,槟榔碱导泻成功294只家犬,其中45只家犬检出细粒棘球绦虫,检测结果显示,采用本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)的检测结果显示与用ELISA法的检测结果均为阳性,二者符合率为100%,说明本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的检测准确率和稳定率。

[0033] 综上所述,本发明中的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的敏感性、特异性和稳定性,能够随身携带,即时即地进行现场的测试,不需要专门的测试辅助设备,缩短了测试时间,提高了测试效率,尤其适用于农牧区的使用,另外,本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)对犬粪进行测试,防止了对犬的伤害,使得检测工作更为简便。

[0034] 以上技术特征构成了本发明的实施例,其具有较强的适应性和实施效果,可根据实际需要增减非必要的技术特征,来满足不同情况的需求。

[0035] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精

神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

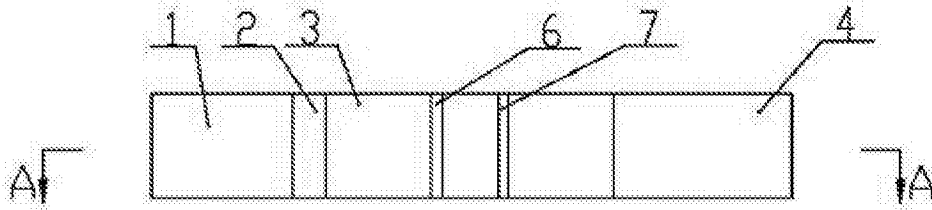


图1



图2

专利名称(译)	一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN107402298A	公开(公告)日	2017-11-28
申请号	CN201610328921.X	申请日	2016-05-18
[标]发明人	朱劭远 李宝良 焦伟 杨安 姚霞 范继康		
发明人	朱劭远 李宝良 焦伟 杨安 姚霞 范继康		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/5308 G01N2333/43543		
代理人(译)	周高		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒及其使用方法，该犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒，包括样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和底板，在底板的左部顶端固定有样品垫，在样品垫的右部与底板之间固定有金标垫，在底板的右部顶端固定有吸水垫，在金标垫与吸水垫之间固定有硝酸纤维素膜。本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒(胶体金法)具有较高的敏感性、特异性和稳定性，能够随身携带，即时即地进行现场的测试，不需要专门的测试辅助设备，缩短了测试时间，提高了测试效率，另外，本发明的犬粪包虫病抗原快速检测试剂盒对犬粪进行测试，防止了对犬的伤害，使得检测工作更为简便。

